



TITLE:

Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ishida, Yuki

CITATION:

Ishida, Yuki. Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6. 京都大学, 2016, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2016-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19903>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-09-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	石田 裕樹
論文題目	Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6 （SHIV-89.6の派生ウイルスである中和抵抗性かつCCR5指向性SHIV-MK38分子クローンの作製）		
（論文内容の要旨）			
<p>本論文は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）ワクチン候補の感染防御効果を適切に評価できなかった従来のサル/ヒト免疫不全ウイルス（SHIV）を改良して、よりHIVワクチン開発に適したSHIV/サルモデルを構築することを目的とした研究であり、全2章から構成されている。</p> <p>第1章では本研究の背景について論じている。ワクチン開発には動物モデルが必須であるが、HIVは宿主域が非常に狭く、ヒトとチンパンジーにしか感染しないため、HIVを用いた動物実験を行うことができない。このため、サルにエイズ様症状を引き起こし、かつHIVに近縁なウイルスであるサル免疫不全ウイルス（SIV）がHIVの病態の理解に大きく貢献してきた。しかし、SIVとHIVの外被タンパク質（Env）の相同性は低く、互いの中和抗体は交差反応を示さない。従って、抗HIV中和抗体誘導型ワクチンの評価はSIV/サルモデルでは行うことができない。そこで、HIVのEnvと一部のアクセサリ遺伝子をSIVの該当領域と置き換えたSHIVが開発された。SHIVはこれまで多くの前臨床試験に用いられてきたが、SHIV/サルモデルで防御効果が認められたワクチン候補が臨床試験及びSIV/サルモデルで効果がないことが報告され、SHIV/サルモデルはワクチンの防御効果を正しく評価できないことが明らかとなった。また、HIV/SIVが感染する時に第二受容体として細胞膜上に存在するケモカインレセプター分子の1つであるCCR5を使用するのに対し、従来のSHIVは主に別のケモカインレセプター分子CXCR4を使用することから、標的細胞が異なる結果、その病態も異なることもわかってきた。そこで、従来のCXCR4指向性SHIV-KS661クローンウイルスのEnvに5つのアミノ酸変異を導入し、CCR5指向性の新規SHIVが作製された。そして、個体継代によりアカゲザルに馴化させ、変異が蓄積して遺伝的多様性をもつSHIV-MK38株が得られた。サルに馴化したSHIV-MK38株は、元のSHIV-KS661クローンウイルスに比較して感染サル血漿中の中和抗体に対して抵抗性であった。そこで、申請者はSHIV-MK38の中和抵抗性について詳細に解析することが、よりよいSHIV/サルモデルを構築する上で重要と考えた。</p> <p>第2章ではSHIV-MK38株とその分子クローンの中和感受性を詳細に解析し、中和抵抗性の獲得とサル個体内での持続感染性の関係を理解することを目的とした。中和抵抗性を決定する領域はEnvの膜外部領域である。そこで、SHIV-MK38分子クローンを作製するた</p>			

めに、SHIV-MK38株の膜外部領域を含む遺伝子断片をSHIV-KS661クローンの相当領域と置換し、6つの感染性分子クローンを得た。これら分子クローンの中和抵抗性を詳細に解析するために、SHIV-MK38株感染サル血漿、HIV感染者のプール血漿及び中和モノクローナル抗体を用い、中和試験を行った。SHIV-MK38株は感染サル自家血漿に中和されず、中和抵抗性であった。6クローンのうちSHIV-MK38株と同等の中和抵抗性を保持していたクローンはMK38#814及びMK38#818の2クローンであった。続いて、中和抵抗性のレファレンスウイルスであるPV0.4と同程度の中和抵抗性を保持していたウイルスはSHIV-MK38及びMK38#818であった。MK38#814はプール血漿に対しPV0.4と中和感受性の標準ウイルスクローンである6535.3との中間の中和感受性を示した。続いて、HIVのEnvに対する中和モノクローナル抗体（KD-247、4E10、2F5）及び、ウイルスの第一受容体であり、中和効果があることが知られている可溶性CD4を用いた中和試験を行った。その結果、SHIV-MK38株及びMK38#818はPV0.4と同等の中和抵抗性を示した。従って、SHIV-MK38株の性状を最もよく反映するクローンはMK38#818であった。MK38#818はCCR5阻害剤に対して濃度依存的に感染率が低下したため、CCR5指向性であることが確認された。また、MK38#818は、サル末梢血単核球培養系で親株であるSHIV-MK38株よりも効率よく複製することがわかった。次に、MK38#818がサル個体内で持続感染するか評価するために、アカゲザル3頭にMK38#818を直腸内接種した。中和感受性である元のSHIV-KS661クローンウイルスは直腸内接種すると宿主の抗体応答によってコントロールされることが報告されているが、MK38#818を3頭のアカゲザルに直腸内接種した結果、3頭中1頭のアカゲザルで高いウイルス量を維持し持続感染した。血中の抗体価を測定することにより全てのアカゲザルで抗体応答が観察され、持続感染したサルでは最も抗体価が高かった。すなわち、中和抵抗性の獲得がサル個体内での持続感染に関与している可能性が示唆された。

今回、中和抵抗性かつCCR5指向性SHIV分子クローンを作製し、サル個体内で高いウイルス量で持続感染しうることを確認した。3頭中1頭のアカゲザルでのみ高いウイルス量で持続感染したが、更に多くのクローンを調べることでより優れた中和抵抗性分子クローンを見出せる可能性がある。また、*env*遺伝子領域以外の適応変異も検討する余地がある。本研究は、HIV感染病態の解明や抗HIVワクチン開発のための有効な霊長類モデルの構築に貢献するものである。

(論文審査の結果の要旨)

エイズの病原ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス(HIV)による感染症は依然として世界的な公衆衛生上の重要課題である。多剤併用療法が確立され、HIV感染症は減少傾向にあるが、2014年の国際連合エイズ合同計画による報告では、3690万人がHIVに感染しており、年間200万人が新たにHIVに感染し、120万人がエイズで死亡したと推定されている。HIV感染症の制圧に向け、様々な抗HIVワクチンが開発され、サルエイズモデルを用いた前臨床試験が行われてきた。しかし、これまでサルモデルによる抗HIVワクチン評価に使用されてきたサル／ヒト免疫不全ウイルス (SHIV) は、HIVやサル免疫不全ウイルス (SIV) に対して抑制効果を持たないワクチン候補によっても容易に複製が抑制されることが近年明らかとなった。このようなことから、先行研究においてHIVやSIVと同様の性状をもつSHIVの作製を目指し、第二受容体としてケモカインレセプター分子CXCR4に指向性のあるSHIVを別のケモカインレセプター分子CCR5指向性に変化させた。すなわち、CXCR4指向性SHIV-KS661クローンウイルスの外皮タンパク (Env) に5つのアミノ酸変異を導入することによりCCR5指向性に変化させ、アカゲサルに馴化させることによりSHIV-MK38株を得た。

第1章において、申請者は本研究の背景について詳細に論じている。その上で、HIVやSIVが中和抵抗性であるのに対し、従来使用されてきたSHIVが中和感受性であることに注目し、アカゲサルに馴化したSHIV-MK38株の中和抵抗性について詳細に解析することが、よりよいSHIV/サルモデルを構築する上で重要との考えに至った。

第2章では、SHIV-MK38株とその分子クローンの中和感受性について詳細に解析し、中和抵抗性の獲得とサル個体内での持続感染性の関係を理解することを目的とした。初めにSHIV-MK38株のenv遺伝子を中心とするウイルスゲノム領域由来の分子クローンを元のSHIV-KS661クローンに挿入することで6つの感染性分子クローンを得た。それら6つの分子クローンと親株のSHIV-MK38株の中和感受性について感染サルの自家血漿やヒトのHIV感染者のプール血漿、中和モノクローナル抗体を用い、詳細な解析を行った。SHIV-MK38株は、既に中和抵抗性であると報告されているHIV-1標準クローンウイルスPV0.4と同等の中和抵抗性を保持していた。そのSHIV-MK38株の中和抵抗性を最も良く反映していた分子クローンはMK38#818であった。第二受容体指向性とサル末梢血単核球培養での複製能について評価したところ、MK38#818はCCR5指向性であり、SHIV-MK38株と同等レベル以上の複製能を示した。以上のことから、MK38#818が接種ウイルスとして有望であると考えられたため、申請者は、次にサル個体内で高いウイルス量を維持して持続感染するかを評価した。中和感受性である元のSHIV-KS6

61クローンウイルスは直腸内感染させると宿主の抗体応答によってコントロールされることが報告されているが、MK38#818を3頭のアカゲザルに直腸内接種した結果、3頭中1頭のアカゲザルで高いウイルス量を維持し持続感染した。血中の抗体価を測定したところ全てのアカゲザルで抗体応答が観察され、持続感染したサルでは最も抗体価が高かったことから、ウイルスの中和抵抗性の獲得がサル個体内における高いウイルス量での持続感染に関与している可能性を示唆した。

今回、MK38#818では3頭中1頭のアカゲザルでのみ高いウイルス量で持続感染したが、更に多くのクローンを調べることでより優れた中和抵抗性分子クローンを見出せる可能性があること、また、*env*遺伝子領域以外の適応変異も検討する余地があることを申請者は指摘している。以上のように、申請者は本論文において、SHIV/サルモデルの問題点を克服し、抗HIV中和抗体誘導型ワクチンの防御効果を適切に評価できる新規SHIV/サルモデルの構築に大きく貢献した。本論文の内容に関しては、国際学術誌（Journal of General Virology誌）に掲載が確定しており、その価値は当該分野の研究者においても高く評価されている。このように、本論文は、自然と人間との自立的な関わりの限界特性を明らかにし、自然環境動態の将来予測を行うための方法論と実際を教育研究することを目指して設立された相関環境学専攻自然環境動態論講座に相応しい内容を備えたものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また平成28年2月19日、論文内容とそれに関する事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降